

Diagnostische Systeme zum Nachweis von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

R. Stephan

Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene, Universität Zürich, Schweiz

Korrespondenz an: Prof. Dr. Roger Stephan, Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene,
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich, Winterthurerstr. 272, CH-8057 Zürich, Schweiz,
Tel.: 0044 63 58657, E-mail: stephanr@fsafety.uzh.ch

Eingegangen: 18. Januar 2007; Angenommen: 5. Februar 2007

Key words: FISH-Technik, Johne'sche Krankheit, MAP, *Mycobacterium avium*, NASBA-Technik, Paratuberculose, PCR,

Zusammenfassung: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) ist der Erreger der Paratuberculose oder auch Johne'schen Krankheit, einer chronisch verlaufenden Darmentzündung der Wiederkäuer. In Milchviehbetrieben ist die Paratuberculose als grosses Problem mit hohen wirtschaftlichen Verlusten zu werten. Die Tatsache, dass *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* auch bei Morbus Crohn Patienten isoliert wurde, führte zu Diskussionen um den möglichen kausalen Zusammenhang zwischen MAP und Morbus Crohn, der jedoch bis heute nicht bewiesen ist. MAP haben dennoch eine besondere milchhygienische Relevanz erhalten.

Die klassische kulturelle Nachweismethodik gestaltet sich aufwändig und langwierig. In der Primärisolation dauert es 3–4 Monate, bis Kolonien auf einem Festmedium sichtbar sind. Die lange Nachweiszeit macht es auch notwendig, dass zu untersuchendes Probenmaterial mit einer hohen Begleitflora einem Dekontaminationsschritt unterzogen werden muss. Dafür stehen verschiedene Chemikalien zur Verfügung, die aber auch einen negativen Effekt auf eine geringe Anzahl MAP haben können. Immunologische Methoden, die in einer frühen Phase der Infektion auf der zellulären Immunantwort, in einer späteren Phase der Infektion auf der humoralen Immunantwort basieren, weisen in der Regel schlechte Sensitivitäten auf. Seit einigen Jahren hat man das Potential der molekularen Methoden und insbesondere der PCR zur Diagnose der Paratuberculose erkannt.

Abstract: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) is the etiological agent for bovine paratuberculosis also known as Johne's disease. The infection of domestic food animals with MAP organisms is associated with significant economic losses to the livestock industry worldwide through subclinical effects and subsequent death of the affected animals. The suggestions by some investigators of a possible link between human Crohn's disease and MAP has led to increased awareness of these micro-

organisms as far as public health is concerned. However, due to the complex nature of human Crohn's disease as well as conflicting experimental evidence, a definitive link between MAP and Crohn's disease can neither be confirmed nor discarded at present.

The classical detection method is based on isolation of MAP organisms from samples by culture techniques. However, this approach is labor intensive and time consuming. Moreover, this approach may underestimate or fail to detect MAP organisms as a result of the chemical decontamination step involved in order to prevent culture overgrowth by competing microflora. This step may also be deleterious to the MAP organisms in the sample. Immunology based detection methods are faster than culture, but are hampered by low sensitivity and cross reactivity problems. PCR provide a rapid alternative for qualitative and sensitive detection of MAP. Hence, to date a number of conventional PCR assays designed for MAP detection have been described.

1. Einleitung

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP), ein säurefestes, schwach gram-positives, aerobes, unbewegliches Stäbchen gehört zum *M. avium* Komplex (MAC). MAP ist der Erreger der Paratuberculose oder auch Johne'schen Krankheit, einer weltweit verbreiteten, ansteckenden, chronisch verlaufenden Darmentzündung der Wiederkäuer. Die Infektion führt in den betroffenen Beständen zu Milch- und Mastleistungsrückgängen, Fruchtbarkeitsstörungen, höherer Infektionsanfälligkeit und Todesfällen. Die Infektion zeichnet sich durch eine sehr lange Inkubationszeit (4 Monate bis 15 Jahre) mit der klinischen Erkrankung als Terminalstadium dieses Prozesses aus. Die klinischen Fälle stellen aber nur die Spitze des Eisberges dar. Die jährliche Verlustrate an adulten Tieren einer Herde kann von 3 bis 10% variieren. In Jungtieren wird selten ein klinischer Befund ausgebildet, und wenn, dann nur in Herden mit hohen Infektionsraten gepaart mit schlechtem Management.

Untersuchungen zur Paratuberkuloseprävalenz zeigen, dass vor allem in Milchviehbetrieben sehr hohe Herdenprävalenzen gefunden werden. In Milchviehbetrieben ist die Paratuberkulose als grosses Problem mit hohen wirtschaftlichen Verlusten zu werten (Ott et al., 1999). Nachdem seit längerer Zeit bekannt war, dass MAP aus Milch von klinisch an Paratuberkulose erkrankten Tieren isoliert werden konnten, zeigen neuere Untersuchungen, dass MAP auch in Milch von subklinisch infizierten Kühen nachgewiesen werden kann (Sweeney et al., 1992; Streeter et al., 1995). Zudem lassen die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen vermuten, dass MAP, verglichen mit anderen *Mycobacterium* spp., eine höhere Thermoresistenz aufweisen und möglicherweise eine Milchpasteurisation überleben könnten.

Chiodini et al. (1984) konnten erstmals auch MAP aus Darmgewebe von Morbus Crohn Patienten isolieren. Eine kürzlich erschienene Arbeit im Lancet beschreibt auch den Nachweis von MAP aus Blut von Morbus Crohn Patienten (Naser et al., 2004).

Vor dem Hintergrund einer möglicherweise erhöhten Thermoresistenz (Überleben der Dauer- und der HTST-Pasteurisation) sowie dem möglichen kausalen Zusammenhang zwischen *M. avium* subsp. *paratuberculosis* und dem Morbus Crohn haben MAP eine besondere milchhygienische Relevanz erhalten.

Diagnostische Tests zum Paratuberkulose-Nachweis können grundsätzlich in zwei grosse Gruppen eingeteilt werden: eine erste Gruppe, welche den Erreger durch Mikroskopie von Ausstrichen (nach Ziehl-Neelsen), durch die Kultur oder durch molekularbiologische Methoden nachweist, und in eine zweite Gruppe, welche alle immunologischen Nachweismethoden beinhaltet, welche die zelluläre Immunantwort über einen Interferon γ -Test oder – in einer späteren Phase der Infektion – mittels Antikörper nachweisen. Tab. 1 gibt eine Zusammenstellung der Probenmatrices für den Nachweis von MAP und die dafür häufig angewendeten direkten und indirekten Methoden.

2. Molekularbiologischer Nachweis

Seit einigen Jahren hat man das Potential der molekularen Methoden und insbesondere der PCR zur Diagnose der Paratuberkulose erkannt. Ein wichtiger Schritt war die Entdeckung einer repetitiven DNA-Insertionssequenz, IS900 (Collins et al., 1989; Green et al., 1989; Green et al., 1989). IS900 ist eine 1451–1453 bp grosse chromosomale Sequenz, welche in 14–18 Kopien vorliegt.

2.1 PCR Methoden

Den ersten PCR-Tests zum Nachweis von MAP in Kot mangelte es vor allem an Sensitivität im Vergleich mit der Kotkultur (Vary et al., 1990; Whipple et al., 1992). Collins et al. (1993) entwickelten eine verbesserte nested PCR. Bei der nested PCR handelt es sich um eine PCR, die nacheinander zwei Amplifikationsschritte mit zwei unterschiedlichen Primerpaaren durchführt, was zu einer Steigerung der Sensitivität führt, ein solches System aber auch sehr anfällig für Kontaminationen macht. Millar et al. (1996) entwickelten die erste PCR, die MAP in Milch nachwies. In dieser englischen Studie wurden mittels einer IS900 PCR Rohmilchproben und dann in grösserem Um-

fang auch pasteurisierte Milchproben untersucht. Der damals verwendeten Methode in der Matrix Milch mangelte es allerdings wiederum an Sensitivität. Vor allem wirkten sich bei der beschriebenen Probenaufbereitung die im Probenmaterial Milch enthaltenen Inhibitoren negativ auf die PCR aus.

Auch andere, mitunter heute auch kommerziell angebotene Nachweissysteme basieren auf dem Nachweis des IS900 Elements. Die meisten dieser Systeme weisen aber keine internen Amplifikationskontrollen auf, was aber heute für eine diagnostische PCR zwingend notwendig ist.

In jüngerer Zeit wurden nun auch IS900 Elemente in non-MAP Mykobakterien gefunden (Cousins et al., 1999; Naser et al., 1999; Englund et al., 2002), was die Spezifität eines solch basierten MAP Nachweissystems in Frage stellt. Auch in eigenen Untersuchungen wurden kürzlich neue, bislang nicht beschriebene *Mycobacterium* spp. gefunden (*M. chelonae*, *M. terrae* und *M. xenopi*), die mittels der von Hermon-Taylor et al. (2000) beschriebenen IS900 basierten nested-PCR falsch positive Ergebnisse lieferten (Tasara et al., 2005).

Vor diesem Hintergrund wurde in unserer Arbeitsgruppe eine neue Methode zum Nachweis von MAP entwickelt, die auf einer anderen Zielsequenz, dem MAP F57-Gen basiert (Tasara and Stephan, 2005). Diese Methode erwies sich als sehr spezifisch und zeigte zudem aufgrund einer optimierten DNA Extraktion für Milch und andere Matrices eine gute Sensitivität. Diese Methode wurde im Folgenden im Rahmen von zwei Feldstudien eingesetzt, um Prävalenzdaten zum Vorkommen von MAP in Bestandesrohmilchproben und in Probenmaterial (Kotproben, Milchproben, Gewebeproben) von normal geschlachteten Milchkühen zu erhalten (Bosshard et al., 2006). Die Tabellen 2 und 3 geben einen Überblick über Arbeiten, die im Zeitraum der letzten fünf Jahre die Etablierung von single-PCR, nested-PCR und RT-PCR Systemen beschrieben haben.

Die Zellen von MAP sind aufgrund ihrer Fähigkeit in Makrophagen überleben zu können und der damit zusammenhängenden speziellen Zellwandstruktur viel resistenter gegen eine Zelllyse. Methoden, die mit SDS-Proteinase K, 6 M-Guanidin-Thiocyanat oder mit einem Kochschritt arbeiten, sind

Tab. 1 Probenmatrices und häufig verwendete direkte und indirekte Methoden zum Nachweis von MAP.

Tier, Herdenlevel	
Kotproben	Kultur, ELISA, PCR
Blutserum	Immunologische Methoden
Bestandesmilch	ELISA, PCR
Einzeltier	
Kotproben	ZN-Färbung, Kultur, ELISA, PCR
Blutproben	Immunologische Methoden
Einzelmilch	ELISA, PCR
Lebensmittel	
Milch	Kultur, PCR
Wasser	Kultur, PCR
Muskulatur	Kultur, PCR

nicht oder nicht ausreichend in der Lage, die DNA von MAP freizusetzen. Aus diesem Grund scheint ein weiterer Schritt in der Probenaufarbeitung unumgänglich, nämlich eine zusätzliche mechanische Bearbeitung des Probenlysates z. B. mittels RiboLyser™. Dieses System besteht aus einer Hochgeschwindigkeits-Zentrifuge, die mit Pendelbewegungen im Uhr- und Gegenuhrzeigersinn sowie Auf- und Abbewegungen in der Horizontalen arbeitet. Zum Aufbrechen der Zellwand kommt es durch die in Vibration versetzten Partikel aus Silikon und Keramik.

Es wurde versucht, die Nachweisempfindlichkeit der PCR-basierten Methoden zu verbessern. So lagen die Hauptstrategien der letzten Jahre darin, die Sensitivität entweder durch einen vorgelagerten Schritt einer immuno-magnetischen

Separation (IMS) oder einer Vorkonzentrierung der MAP über magnetische Kügelchen beschichtet mit Phagen oder Peptiden zu erreichen. Tab. 4 gibt einen Überblick über Arbeiten der letzten Jahre mit dieser Ausrichtung.

2.2 NASBA-Technik

NASBA ist eine Technologie zur isothermalen, d. h. auf nur einer Temperaturstufe ablaufenden Amplifikation von RNA-Sequenzen mittels einer bestimmten RNA Polymerase. In einem weiteren Schritt erfolgen daraufhin die Detektion der amplifizierten RNA-Sequenzen sowie die Ausgabe der Ergebnisse in einem einfachen und übersichtlichen Format. Diese Technik wurde von Rodriguez et al. (2004) etabliert, um MAP in Milch und Wasser nachweisen zu können.

2.3 FISH-Technik

Die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) ist ein Verfahren, um unter anderem die mRNA in der Bakterienzelle sichtbar zu machen. Es werden bei einer solchen Färbung nur diejenigen Zellen angefärbt, in denen das zu untersuchende Gen aktiv ist und in denen daher die mRNA vorliegt (Nachweis lebender Zellen). Diese Technik wurde in zwei unterschiedlichen Arbeiten angewandt, um einerseits MAP in Biofilmen von wasserführenden Systemen und andererseits in Gewebe von Morbus Crohn Patienten nachzuweisen (Romero et al., 2005; Lehtola et al., 2006).

3. Weitere Diagnostik

3.1 Direkte Nachweismethoden

3.1.1 Mikroskopie von Gewebematerial

3.1.1.1 Biopsie

Vom Biopat werden auf einem Objektträger Ausstriche hergestellt, die anschliessend nach Ziehl-Neelsen angefärbt werden. Im Präparat werden säurefeste (rote) Stäbchen gesucht. Typisch für MAP ist ihre Anordnung in Klumpen oder Nestern innerhalb der Makrophagen. Anhand der Morphologie, Grösse und Anordnung wird die Diagnose gestellt. Da sich in solchen Ausstrichen auch häufig Umweltmykobakterien befinden, die sich ebenfalls anfärben lassen, weist diese Methode eine schlechte Spezifität auf.

3.1.1.2 Histopathologie

Material vom distalen Ileum und von ileocaecalen Lymphknoten wird in Formalin fixiert und daraus Dünnschnitte hergestellt, die mit Hämatoxylin-Eosin (HE) und nach Ziehl-Neelsen (ZN) gefärbt werden. Auch hier liegen die Bakterien typischerweise in Nestern innerhalb von Makrophagen (obligat intrazelluläre Erreger) zusammen. In der HE-Färbung wird vor allem nach Makrophagen vom epitheloiden Typ gesucht. Die reine mikroskopische Untersuchung kann aber auch hier nicht zwischen den verschiedenen säurefesten Stäbchen unterscheiden.

3.1.2 Kultivierung von MAP

Die Kultivierung gestaltet sich aufwändig und schwierig, denn einerseits weisen die Erreger ein sehr langsames Wachstum auf, und andererseits benötigen sie einen Nährboden mit My-

Tab. 2 Beispiele für kürzlich publizierte konventionelle PCR Systeme.

Zielsequenz	PCR Format	Literaturstelle
IS Mav2	Single PCR	Shin et al., 2004
F57	Single PCR	Vansnick et al., 2004
IS 900, hspX	Single PCR	Clark et al., 2006
IS 900, F57	Single PCR	Herthnek et al., 2006
IS 900, F57	Multiplex PCR	Tasara et al., 2005
IS 900	Nested-PCR	Englund et al., 2001
IS Map02	Nested-PCR	Strabel et al., 2005

Tab. 3 Beispiele für kürzlich publizierte real time-PCR Systeme.

Zielsequenz	Interne Amplifikationskontrolle	Nachweislimite	Literaturstelle
IS 900*	nein	<100 Zellen/ml	O'Mahony et al., 2004
IS 900, 251, UVA*	nein	Keine Angabe	Rajjev et al., 2005
IS 900*	ja	100 Zellen/ml Wasser oder 20 ml Milch	Rodriguez-Lazaro et al., 2005
IS 900°	nein	0.07 Zellen	Ravva et al., 2005
IS 900+	nein	500 cfu/g Kot	Bogli-Stuber et al., 2005
F57*	ja	10 Zellen/10 ml Milch	Tasara and Stephan, 2005
IS 900, hspX	ja	Keine Angabe	Brey et al., 2006
IS 900	nein	100–10.000 cfu/Kot	Jaravata et al., 2006

*Sonden; °SYBR green und Sonden; +SYBR green

Tab. 4 Optimierung der Sensitivität PCR basierter Methoden.

Konzentrationsschritt	Zielsequenz der PCR	Literaturstelle
IMS	IS 900	Grant et al., 2000
Beads mit Phagen	IS Mav2	Stratmann et al., 2002
IMS	IS 900	Khare et al., 2004
IMS	IS 900	Whan et al., 2005
aMptD Peptid	IS Mav2	Stratmann et al., 2006

IMS = Immunomagnetische Separation

cobactin-Zusatz als Wachstumsfaktor. In neuerer Zeit wurden zudem so genannte «Spheroblasten» (eine Form der MAP mit Zellwanddefekt) isoliert. Diese besondere Form der MAP färbt sich nicht mittels der Ziehl-Neelsen-Färbung an und vermehrt sich in der Kultur noch viel langsamer.

Die Kultur von MAP gelang erstmals Twort und Ingram (1912). In Kulturröhrchen, die versehentlich über einige Monate nicht gereinigt wurden, wuchsen Satellitenkolonien um *Mycobacterium phlei*. *Mycobacterium phlei* diente dabei als Mycobactin-Lieferant, ein Eisenchelatbildner, der zur Hydroxamatgruppe der Siderophore gehört. Dieser essentielle Wachstumsfaktor kann von MAP selber in der Kultur nicht gebildet werden.

Auf Festmedium stellt sich *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* als kleine (1–5 mm), feste, rauhe bis glatte, glänzende und in der Regel unpigmentierte Kolonie dar. Bei Schafen wurden z. T. auch pigmentbildende Stämme gefunden.

Das Anzüchten der langsam wachsenden Organismen wird üblicherweise auf einem eigelbhaltigen Medium mit Mycobactinzusatz vorgenommen: HEYM (Herrold's egg yolk medium), Löwenstein-Jensen-Medium, modifiziertes Dubois-Medium und diverse Middlebrook-Medien. Eine kürzlich erschienene Arbeit vergleicht vier verschiedene Medien für den Nachweis von Typ II und Type I/III Stämmen (De Juan et al., 2006). In der Primärisolation dauert es 3–4 Monate, bis Kolonien auf einem Festmedium sichtbar sind, ein Umstand, der dazu führen kann, dass die Mycobakterien während der langen Inkubationszeit von kompetitiver Flora überwachsen werden können. Es ist daher notwendig, dass Probenmaterial mit einer hohen Begleitflora (z. B. Rohmilch) einem Dekontaminationsschritt unterzogen werden muss. Dafür stehen verschiedene Chemikalien zur Verfügung, die wiederum aber auch einen negativen Effekt auf das Wachstum einer geringen Anzahl an MAP haben können.

Die Kultur weist bedingt durch die Wachstumsabhängigkeit von *Mycobacterium paratuberculosis* von Mycobactin J eine Spezifität von annähernd 100 %, jedoch eine Sensitivität von nur rund 50 % auf. Die kulturelle Methode gilt aber trotz all ihrer Nachteile heute nach wie vor als Goldstandard.

Als Alternative zum herkömmlichen, konventionellen Nachweis von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* hat sich eine Methode aus der Tuberkulose-Diagnostik etabliert. Diese Kulturmethode basiert auf der Detektion von Radioisotopen. Dazu wird ein ^{14}C -markiertes Substrat (meist Palmitinsäure) in einem flüssigen Kulturmedium zu radioaktivem $^{14}\text{CO}_2$ metabolisiert, welches dann in der Gasphase über der Kultur gemessen werden kann. Bereits schon 9 Tage nach der Beimpfung konnte mittels eines BACTEC 7H12-Middlebrook-Medium Wachstum nachgewiesen werden. Diese Methode wurde weiterentwickelt und liegt heute auch als nicht radioaktive Methode vor.

3.2 Indirekte Nachweismethoden

Eine MAP-Infektion äussert sich in einem breiten Spektrum immunologischer Antworten. In einer frühen, subklinischen Infektion dominiert die T-Zell vermittelte, zelluläre Immunantwort, wohingegen in einer späteren Phase der Infektion die antikörpervermittelte, humorale Immunantwort im Vordergrund steht. So wird auch aus dem Blickwinkel der Diagnos-

tik zur Erkennung der Frühphase einer Infektion die zelluläre Immunantwort über einen Interferon γ -Test, in einer späteren Phase dann Antikörper mittels ELISA nachgewiesen. Der Nachteil der immunologischen Methoden ist die schlechte Sensitivität, die im Bereich von etwa 50 % liegt.

3.2.1 Intradermaler Johnin-Test

Es handelt sich dabei um eine allergische Reaktion (zelluläre Immunität) sensibilisierter Tiere, die nach intradermaler Verabreichung von Antigen eine ödematöse Schwellung der Haut zeigen. Dazu werden dem zu testenden Tier 0.2 ml Johnin intrakutan appliziert und 24 bis 48 Stunden nach der Injektion die Reaktion bewertet. Eine Dickenzunahme der Haut an der Injektionsstelle von mehr als 5 mm gilt als positiv. Statt Johnin wird auch ein aviäres, gereinigtes Proteinderivat (= PPD) verwendet, dessen Wirkung aber erst nach 72 Stunden abgelesen wird.

Der Test erlaubt es allerdings nicht, alle infizierten Tiere aufzufinden. In einer älteren Arbeit wurde gezeigt, dass die Reaktion bei einigen Tieren bei Mehrfachtestung positiv oder negativ ausfallen kann. Zudem wurden mittels intradermale Johnin-Test bis zu 54 % falsch-positive und 40 % falsch-negative gefunden (Larsen und Kopecky, 1965).

3.2.2 IFN-gamma Test

Spezifische Antigene von *Mycobacterium paratuberculosis* stimulieren im Reagenzglas (*in vitro*) T-Zellen. Wenn diese die Antigene erkennen, weil sie im Rahmen einer Infektion schon einmal präsentiert wurden, produzieren sie vermehrt verschiedene Botenstoffe, unter anderem Interferon- γ . Im Zellüberstand kann dieses gemessen werden.

3.2.3 Antikörpernachweis

Zum Antikörpernachweis werden überwiegend Sandwich-ELISA Systeme angewendet, die durch verschiedene Anbieter auch kommerziell erhältlich sind. Es bestehen aber mitunter grosse Unterschiede in den verwendeten Antigenen, was einen Vergleich von Ergebnissen sehr erschweren kann. Dies ist vor allem dann der Fall, wenn mit dem Protoplasmic Antigen gearbeitet wird; es ist zudem notwendig, dass eine Präadsorption mit *M. phlei* durchgeführt wird, um unspezifische Reaktionen verhindern zu können. Eine kürzlich erschienene Arbeit vergleicht drei kommerziell erhältliche Systeme (McKenna et al., 2006).

4. Literatur

- Bogli-Stuber, K., Kohler, C., Seitert, G., Glanemann, B., Antognoli M. C., Salman, M. D., Wittenbrink, M. M., Wittwer, M., Wassenaar, T., Jemmi, T. und Bissig-Choisat, B. (2005) Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Swiss dairy cattle by real-time PCR and culture: a comparison of the two assays. J Appl Microbiol 99:587–597.
- Bosshard, C., Stephan, R. und Tasara, T. (2006) Application of an F57 sequence-based real-time PCR assay for *Mycobacterium paratuberculosis* detection in bulk tank raw milk and slaughtered healthy dairy cows. J Food Protect 69:1662–1667.
- Brey, B. J., Radcliff, R. P., Clark, D. L. und Ellingson, J. L. (2006) Design and development of an internal control plasmid for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using real-time PCR. Cell Probes 20:51–59.

- Chiodini, R. J., Van Kruiningen, H. J., Merkal, R. S., Thayer, W. R. und Coutu, J. A. (1984) Characteristics of an unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease. *J Clin Microbiol* 20:966–971.
- Clark, D. L., Anderson, J. L., Koziczowski, J. J. und Ellingson, J. L. (2006) Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* genetic components in retail cheese curds purchased in Wisconsin and Minnesota by PCR. *Mol Cell Probes* 20:197–202.
- Collins, D. M., Gabric, D. M. und de Lisle, G. W. (1989) Identification of a repetitive DNA sequence specific to *Mycobacterium paratuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett* 51:175–178.
- Collins, M. T., Angulo, A., Buerget, C. D., Hennager, S. G., Hietala, S. K., Jacobson, R. H., Whipple, D. L. und Whitlock, R. H. (1993) Reproducibility of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for bovine paratuberculosis among eight laboratories. *J Vet Diagn Invest* 5:52–55.
- Collins, D. M., Stephens, D. M. und de Lisle, G. W. (1993) Comparison of polymerase chain reaction tests and faecal culture for detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces. *Vet Microbiol* 36:289–299.
- Collins, D. M., Hilbink, F., West, D. M., Hosie, B. D., Cooke, M. M. und de Lisle G. W. (1993) Investigation of *Mycobacterium paratuberculosis* in sheep by faecal culture, DNA characterisation and the polymerase chain reaction. *Vet Rec* 133:599–600.
- Cousins, D. V., Whittington, R., Marsh, I., Masters, A., Evans, R. J. und Kluver, P. (1999) *Mycobacteria* distinct from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from the faeces of ruminants possess IS900-like sequences detectable IS900 polymerase chain reaction: implications for diagnosis. *Mol Cell Probes* 13:431–442.
- de Juan, L., Alvarez, J., Romero, B., Bezos, J., Castellanos, E., Aranaz, A., Mateos, A. und Dominguez, L. (2006) Comparison of four different culture media for isolation and growth of type II and type I/III MAP strains from cattle and goats. *Appl Environ Microbiol* 72:5927–5932.
- Englund, S., Bolske, G., Ballagi-Pordany, A. und Johansson, K. E. (2001) Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in tissue samples by single, fluorescent and nested PCR based on the IS900 gene. *Vet Microbiol* 81:257–271.
- Englund, S., Bolske, G. und Johansson, K. E. (2002) An IS900-like sequence found in a *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett* 209:267–271.
- Grant, I. R., Pope, C. M., O'Riordan, L. M., Ball, H. J. und Rowe, M. T. (2000) Improved detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk by immunomagnetic PCR. *Vet Microbiol* 77:369–378.
- Green, E. P., Moss, M. T., Hermon-Taylor, J. und McFadden, J. J. (1989) Insertion elements in mycobacteria. *Acta Leprol* 7:239–242.
- Green, E. P., Tizard, M. L., Moss, M. T., Thompson, J., Winterbourne, D. J., McFadden, J. J. und Hermon-Taylor, J. (1989) Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic Acids Res* 17:9063–9073.
- Hermon-Taylor, J., Bull, T. J., Sheridan, J. M., Cheng, J., Stellakis, M. L. und Sumar, N. (2000) Causation of Crohn's disease by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Can J Gastroenterol* 14:521–539.
- Herthnek, D. und Bolske, G. (2006) New PCR systems to confirm real-time PCR detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *BMC Microbiol* 6:87.
- Jaravata, C. V., Smith, W. L., Rensen, G. J., Ruzante, J. M. und Cullor, J. S. (2006) Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine manure using Whatman FTA card technology and Lightcycler real-time PCR. *Foodborne Pathog Dis* 3:212–215.
- Khare, S., Richt, T. A., Santos, R. L., Romano, J., Ficht, A. R., Zhang, S., Grant, I. R., Libal, M., Hunter, D. und Adams, L. G. (2004) Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine milk and feces by a combination of immunomagnetic bead separation-conventional PCR and real-time PCR. *J Clin Microbiol* 42:1075–1081.
- Larsen, A. und Kopecky, K. (1965) Studies on the intravenous administration of johnin to diagnose Johne's disease. *Am J Vet Res* 26:673–675.
- Lehtola, M. J., Torvinen, E., Miettinen, I. T. und Keevil, C. W. (2006) Fluorescence in situ hybridization using peptide nucleic acid probes for rapid detection of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in potable-water biofilms. *Appl Environ Microbiol* 72:848–853.
- McKenna, S., Barkema, H., Keefe, G. und Sockett, D. (2006) Agreement between three ELISAs for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy cattle. *Vet Microbiol* 114:285–291.
- Millar, D., Ford, J., Sanderson, J., Withey, S., Tizard, M., Doran, T. und Hermon-Taylor, J. (1996) IS900 PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cows' milk in England and Wales. *Appl Environ Microbiol* 62:3446–3452.
- Naser, S. A., Felix, J., Liping, H., Romero, C., Naser, N., Walsh, A. und Sfraneck, W. (1999) Occurrence of the IS900 gene in *Mycobacterium avium* complex derived from HIV patients. *Mol Cell Probes* 13:367–372.
- Naser, S., Ghobrial, G., Romero, C. und Valentine, J. (2004) Culture of MAP from the blood of patients with Crohn's disease. *Lancet* 364:1039–1044.
- O'Mahony, J. und Hill, C. (2004) Rapid real-time PCR assay for detection and quantitation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA in artificially contaminated milk. *Appl Environ Microbiol* 70:4561–4568.
- Ott, S. L., Wells, S. J. und Wagner, B. A. (1999) Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. *Prev Vet Med* 40:179–192.
- Rajev, S., Zhang, Y., Sreevatsan, S., Motiwala, A. S. und Byrum, B. (2005) Evaluation of multiple genomic targets for identification and confirmation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates using real-time PCR. *Vet Microbiol* 105:215–21.
- Ravva, S. V. und Stanker, L. H. (2005) Real-time quantitative PCR detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and differentiation from other mycobacteria using SYBR Green and TaqMan assays. *J Microbiol Methods* 63:305–317.
- Rodriguez-Lazaro, D., Lloyd, J., Herrewegh, A., Ikononopoulos, J., D'Agostino, M., Pla, M. und Cook, N. (2004) A molecular beacon-based real-time NASBA assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in water and milk. *FEMS Microbiol Lett* 237:119–126.
- Rodriguez-Lazaro, D., D'Agostino, M., Herrewegh, A., Pla, M., Cook, N. und Ikononopoulos, J. (2005) Real-time PCR-based methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in water and milk. *Int J Food Microbiol* 101:93–104.
- Romero, C., Hamdi, A., Valentine, J. F. und Naser, S. A. (2005) Evaluation of surgical tissue from patients with Crohn's disease for the presence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* DNA by in situ hybridization and nested polymerase chain reaction. *Inflamm Bowel Dis* 11:116–125.
- Shin, S. J., Chang, Y. F., Huang, C., Zhu, J., Huang, L., Yoo, H. S., Shin, K. S., Stehman, S., Shin, S. J. und Torres, A. (2004) Development of a polymerase chain reaction test to confirm *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in culture. *J Vet Diagn Invest* 16:116–120.
- Stabel, J. R. und Bannatine, J. P. (2005) Development of a nested PCR method targeting a unique multicopy element, ISMap02, for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fecal samples. *J Clin Microbiol* 43:4744–4750.
- Stratmann, J., Strommenger, B., Stevenson, K. und Gerlach, G. F. (2002) Development of a peptide-mediated capture PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *J Clin Microbiol* 40:4244–4250.
- Stratmann, J., Dohmann, K., Heinzmann, J. und Gerlach G. F. (2006) Peptide aMPTD-mediated capture PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bulk milk samples. *Appl Environ Microbiol* 72:5150–5158.
- Streeter, R. N., Hoffsis, G. F., Bech-Nielsen, S., Shulaw W. P. und Rings D. M. (1995) Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. *Am J Vet Res* 56:1322–1324.
- Sweeney, R. W., Whitlock, R. H. und Rosenberger, A. E. (1992) *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. *J Clin Microbiol* 30:166–171.

- Tasara, T., Hoelzle, L. E. und Stephan, R. (2005) Development and evaluation of a *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) specific multiplex PCR assay. *Int J Food Microbiol* 104:279–287.
- Tasara, T. und Stephan, R. (2005) Development of f57 sequence based real-time PCR assay for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) detection in milk. *Appl Environ Microbiol* 71:5957–5968.
- Twort, F. und Ingram, G. (1912) A method for isolating and cultivating the *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis*, Johne, and some experiments on the preparation of a diagnostic vaccine for pseudotuberculosis enteritis of bovines. *Proc Roy Soc London* 84:517–545.
- Vansnick, E., de Rijk, P., Vercammen, F., Geysen, D., Rigouts, L. und Portaels, F. (2004) Newly developed primers for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet Microbiol* 100:197–204.
- Vary, P. H., Andersen, P. R., Green, E., Hermon-Taylor, J. und McFadden, J. J. (1990) Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease. *J Clin Microbiol* 28:933–937.
- Whan, L., Ball, H.J., Grant, I.R., Rowe, M.T., 2005. Development of an IMS-PCR assay for the detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in water. *Lett Appl Microbiol* 40, 269–273.
- Whipple, D. L., Kapke, P. A. und Andersen P. R. (1992) Comparison of a commercial DNA probe test and three cultivation procedures for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine feces. *J Vet Diagn Invest* 4:23–27.

To access this journal online:
<http://www.birkhauser.ch/JVL>
